

CHROM. 13,421

TRENNUNG UND BESTIMMUNG DER *cis-trans*-ISOMEREN VON VITAMIN-A-ESTERN DURCH HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE*

HELMUT STEUERLE

BASF AG. Untersuchungslaboratorium, 6700 Ludwigshafen (B.R.D.)

(Eingegangen am 19. September 1980; geänderte Fassung eingegangen am 15. Oktober 1980)

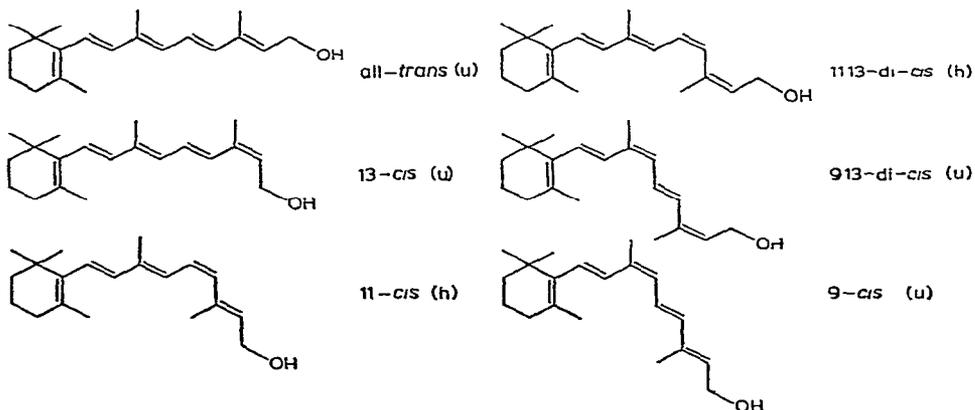
SUMMARY

Separation and determination of the cis-trans isomers of the vitamin A esters by high-performance liquid chromatography

The six known *cis-trans* isomers of the vitamin A esters can be completely separated by high-performance liquid chromatography on aluminium oxide using a mixture of isooctane and diisopropyl ether if the water content of the eluent (which is in the ppm range) is carefully optimized. A method for the quantitative determination of the isomers is presented.

EINLEITUNG

Vitamin A (Retinol) und seine Ester enthalten vier Doppelbindungen in der Seitenkette und eine im Ring. Für ein konjugiertes System mit n nicht-cyclischen Doppelbindungen ist die Zahl der möglichen Stereoisomeren N gegeben durch $N = 2^n$. Für Vitamin A wären demnach sechzehn Individuen zu erwarten. Nach unserer Kenntnis sind bisher sechs *cis-trans*-Isomere bekannt, die alle auch in der Natur vorkommen:



* Herrn Professor Dr. Werner Reif zum 60. Geburtstag gewidmet.

Darunter sind vier nach Pauling¹ sterisch ungehinderte (u) und zwei sterisch gehinderte (h) Moleküle. Bei einer nahe verwandten Verbindung, dem Methylester der Vitamin-A-Säure (Methylretinoat) sind ausser den sechs entsprechenden Individuen noch das 9,11,13-tri-*cis*-² sowie das 7-*cis*- und das 7,13-di-*cis*-Isomere beschrieben³.

Bei der technischen Vitamin-A-Synthese der BASF⁴ werden in der letzten Stufe ein C₁₅- und ein C₅-Stück durch eine Wittig-Synthese zusammengefügt. Diese Reaktion verläuft nicht völlig stereoselektiv. Die neu gebildete Doppelbindung liegt teilweise in der *cis*-Form vor (11-*cis*).

Um die Ausbeute an all-*trans* zu optimieren, ist eine gute analytische Trennung und Bestimmung der Isomeren erforderlich. Dazu ist am besten die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) geeignet.

Die Adsorptionschromatographie von Vitamin A an Aluminiumoxid spielte bereits in der Zeit der Wiederentdeckung der Chromatographie in den dreissiger Jahren eine entscheidende Rolle. So wurde die präparative Anreicherung des Vitamin A aus Fischleberölen an Al₂O₃-Säulen bereits in 1931 publiziert⁵ und über die Isolierung von Vitamin A aus einem Synthesegemisch an Al₂O₃ wurde in 1947 berichtet⁶. Bei diesen Pionierarbeiten wurde allerdings noch kein Bezug genommen auf *cis-trans*-Isomere.

In den medizinisch-chemischen Forschungsstätten der IG-Farbenindustrie wurden bereits Trennungen der Stereoisomeren an Aluminiumoxid durchgeführt, über die später referiert wurde⁷. In den fünfziger Jahren haben mehrere Autoren *cis-trans*-Isomere von Retinol (bzw. dessen Estern) und von Retinal an Aluminiumoxid chromatographiert⁸⁻¹². Später wurden dann bevorzugt Flüssig-flüssig-Chromatographie (LLC)-Systeme verwendet. In die Übergangszeit zwischen klassischer Säulenchromatographie und moderner HPLC fällt eine Arbeit von Härtel¹³, der in einer schon sehr verfeinerten Technik an einem Verteilungssystem mehrere Isomeren quantitativ bestimmen konnte. Auch in der grundlegenden Veröffentlichung von Vecchi *et al.*¹⁴ über die HPLC der Vitamin-A-Isomeren wird hauptsächlich die LLC verwendet, mit der bereits fünf Isomere weitgehend getrennt werden konnten. In der gleichen Arbeit werden auch Aluminiumoxid und Kieselgel als Säulenfüllmaterial erwähnt, an denen jedoch nur die Trennung von 9-*cis*, 13-*cis* und all-*trans* beschrieben wird.

In 1977 erschien dann eine Arbeit über die Trennung von Retinol-Isomeren an Kieselgel¹⁵ und in 1979 wurde die Trennung von vier Isomeren des Retinol-Palmitats, ebenfalls an Kieselgel veröffentlicht¹⁶.

EXPERIMENTELLES UND ERGEBNISSE

Es lag nahe, das von Vecchi bei seinem LLC-System als stationäre Phase verwendete Oxidpropionitril durch eine chemisch gebundene Nitrilphase zu ersetzen, nach dem solche Säulenfüllmaterialien zugänglich waren. Mit einem derartigen HPLC-System wurden bei uns einige Jahre die Isomeren bestimmt. Bei Verwendung von *n*-Heptan als Elutionsmittel ohne besondere Trocknung blieb dabei allerdings noch das 9,13-di-*cis* mit dem 9-*cis* zusammen. Diese Trennung gelang erst bei Verwendung von getrocknetem Isooctan als Elutionsmittel. Entscheidend dabei war die Einstellung des Wassergehaltes im ppm-Bereich.

Eine weitere Verbesserung der Trennung brachte der Einsatz von Aluminiumoxid als Säulenfüllmaterial. Auch hier ist der Wassergehalt des Elutionsmittels von

entscheidender Bedeutung. Bereits geringe Abweichungen vom Optimum bringen drastische Verschlechterungen der Trennung mit sich ohne allgemeine grössere Verschiebungen der Retentionszeiten. Wahrscheinlich bedingt eine geringfügige Änderung des Wassergehaltes im ppm-Bereich (nach Gleichgewichtseinstellung mit dem Aluminiumoxid) keine Änderung der Aktivität im Sinne von Brockmann sondern nur eine Verschiebung der Selektivität des Systems.

Die Löslichkeit von Wasser in Isooctan ist etwa 40 ppm¹⁷. Sie liegt bei einem Modifier-Gehalt von 2% Ethylacetat bei etwa 100 ppm und dürfte für 2% Diisopropylether, die wir als Modifier einsetzen, eher noch tiefer liegen. Der entscheidende Einfluss auf die Selektivität des Vitamin-A-Trennsystems ist also im Wassergehalt des Elutionsmittels im Bereich von 0–100 ppm zu suchen. Fig. 1 zeigt das Chromatogramm der sechs bekannten Isomeren des Vitamin-A-Acetat. Fig. 2 zeigt das entsprechende Chromatogramm der Palmitatisomeren. Dieses Präparat wurde durch Verseifen eines Acetatisomerengemisches und Verestern mit Palmitoylchlorid erhalten. Es enthält noch geringe Mengen der Acetatisomeren.

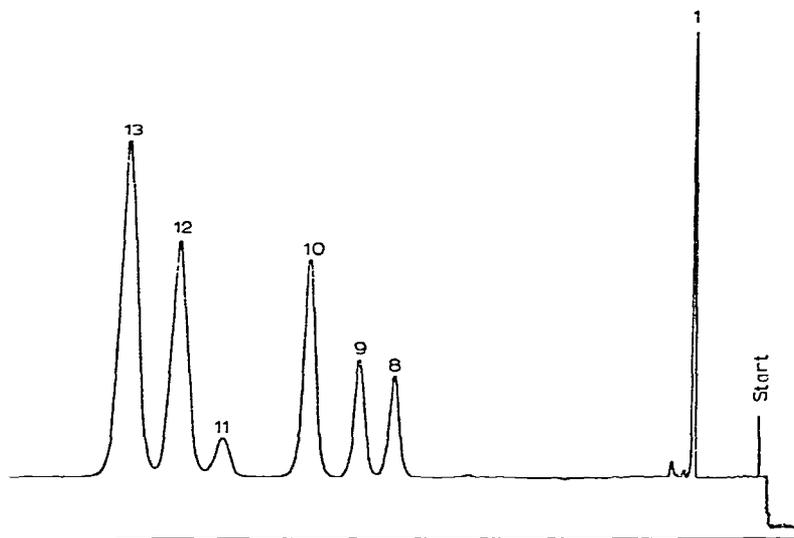


Fig. 1. Chromatogramm eines Isomerengemisches von Vitamin-A-Acetat. Säule: 300 × 3 mm I.D.; Säulenfüllmaterial: LiChrosorb Alox T 5 µm; Elutionsmittel: Isooctan-Diisopropylether (98:2); Durchfluss: 0.7 ml/min. 1 = Anhydro-Vitamin A; 8 = 11, 13-di-*cis*, 9 = 11-*cis*; 10 = 13-*cis*; 11 = 9, 13-di-*cis*; 12 = 9-*cis*, 13 = all-*trans*-Vitamin-A-Acetat.

Chromatographie-System

Verwendet wurden: Pumpe: Modell 6000 A von Waters; Einschleusystem. Modell 7010 von Rheodyne mit 5-µl-Schleife; Säule: 300 × 3 mm I.D. Edelstahl; Säulenfüllmaterial: LiChrosorb Alox T 5 µm (Merck, Darmstadt, G.F.R.); Elutionsmittel: Isooctan-Diisopropylether (98:2, v/v); Durchfluss: 0.7 ml/min; Detektor: UV-VIS PM2DLC (Zeiss) mit einer Wellenlänge von 325 nm und einer Empfindlichkeit von 0.1, 0.5 bzw. 1 a.u.f.s.; Schreiber: Kompensograph III (Siemens) mit einem Papiervorschub von 0.5 cm/min; Auswertung: elektronischer Integrator.

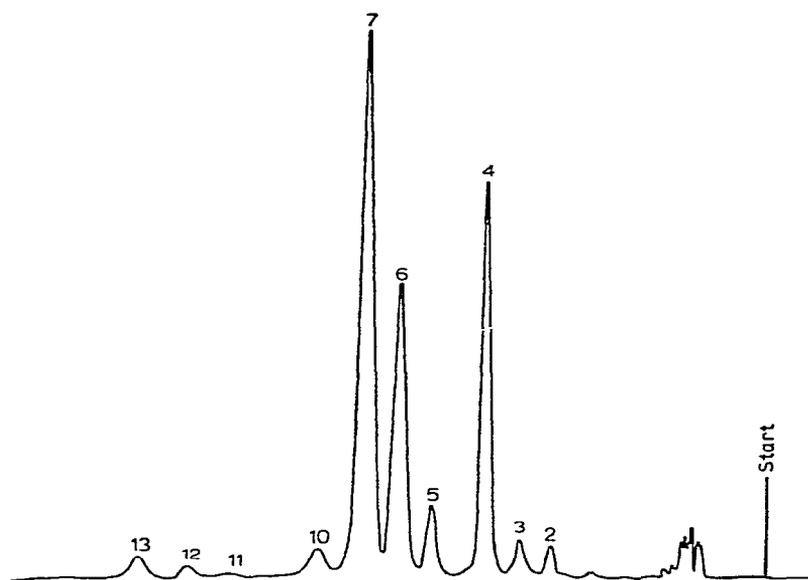


Fig. 2. Chromatogramm eines Isomergemisches von Vitamin-A-Palmitat. Bedingungen wie bei Fig. 1. 2 = 11, 13-di-*cis*; 3 = 11-*cis*; 4 = 13-*cis*; 5 = 9, 13-di-*cis*; 6 = 9-*cis*; 7 = all-*trans*-Vitamin-A-Palmitat; 10, 11, 12 und 13 wie bei Fig. 1.

Die Säule wird nach der üblichen Slurry-Technik mit Tetrachlorkohlenstoff oder mit Diiodmethan-Dioxan gefüllt. Auf die Suspension wird im Füllrohr Chloroform (mit 0.1% Ethanol), das auch zum Nachpumpen dient, geschichtet. Der Druck wird beim Füllen auf etwa 600 bar gesteigert. Nachdem der Druck konstant bleibt, wird ein Gemisch von Isooctan-Diisopropylether (80:20) und schliesslich Elutionsmittel mit einem Durchfluss von 2 ml/min durch die Säule gepumpt. Die Äquilibrierung nimmt etwa acht Stunden in Anspruch. Dann wird die Säule mit einem Gemisch Benzol-Naphthalin-Anthracen getestet. Der Peak von Anthracen sollte einen k' -Wert von mindestens 2 haben und bei der Berechnung des Trennvermögens mindestens 12,000 HETP/m ergeben. Vor dem Einsatz muss die Säule dann unbedingt noch mit einem Gemisch getestet werden, das alle sechs Isomeren des Vitamin-A-Acetats enthält. Bevor die Äquilibrierung endgültig erreicht ist, kann eine Zwischenphase eintreten, bei der das "Triplett" 13-*cis*, 11-*cis*, 11,13-di-*cis* sehr gut, aber das "Triplett" *trans*, 9-*cis*, 9,13-di-*cis* schlecht getrennt ist.

Das Elutionsmittel sowie das Gemisch (80:20) müssen vor dem Einsatz mindestens 24 Stunden mit DriNa (Natrium-Blei-Legierung von Firma Baker, Phillipsburg, NJ, U.S.A.) getrocknet werden. Es wird unmittelbar aus dem 1-l-Messkolben, in dem die Trocknung erfolgt, durch ein 2- μ m-Metallfilter in die Pumpe geleitet. Die Öffnung des Messkolbens wird soweit verschlossen, dass gerade noch ein Druckausgleich möglich ist.

Gelegentlich kommt es vor, dass die Aktivität zunimmt und damit die Retentionszeiten bei gleichbleibender Trennung zu gross werden. Abhilfe kann dadurch

geschaffen werden, dass einige Zeit ein nicht getrocknetes Gemisch (80:20) durchgepumpt wird. Anschliessend wird über wasserfreies Gemisch (80:20) wieder auf Elutionsmittel umgestellt und äquilibriert.

Andererseits kann bei weitgehend unveränderter Retentionszeit von *all-trans*, *9-cis* und *9,13-di-cis* das "Triplett" *13-cis*, *11-cis* und *11,13-di-cis* mit der Zeit zu zwei oder sogar zu einem Peak zusammenrücken. In diesem Fall muss die Säule dadurch regeneriert werden, dass man getrocknetes Gemisch (80:20) über Nacht durchpumpt und dann wieder mit Elutionsmittel äquilibriert.

Wenn sich das Gleichgewicht endgültig eingestellt hat, wird das aus dem Detektor austretende Eluat in das Lösungsmittelvorratsgefäss zurückgeleitet. Bei dieser Arbeitsweise "im geschlossenen System" ändern sich die Trenneigenschaften der Säule über längere Zeiträume nicht mehr. Die sehr geringen Mengen an Vitamin-A-Isomeren, mit denen das Elutionsmittel verunreinigt wird, stören die nachfolgenden Bestimmungen nicht.

Das vorliegende HPLC-System ist geeignet zur Trennung der sechs Isomeren von Vitamin-A-Acetat oder -Palmitat oder -Propionat. Gemische, die verschiedene Ester enthalten, können nur unvollständig getrennt werden. Eine Trennung der reinen *all-trans*-Ester Acetat, Oleat und Palmitat ist möglich (Fig. 3). Ein Gemisch dieser Komponenten wurde in Leberextrakten gefunden nach Fütterungsversuchen mit reinem *all-trans*-Acetat.

Für die Zuordnung der einzelnen Peaks zu den Isomeren standen uns leider keine reinen Vergleichssubstanzen zur Verfügung. *9-cis* und *11-cis* konnten mit synthetisch gewonnenen hochprozentigen Präparaten zugeordnet werden. Für die Identifizierung von *13-cis* und *11,13-di-cis* wurden Mutterlaugen unterschiedlicher Zusam-

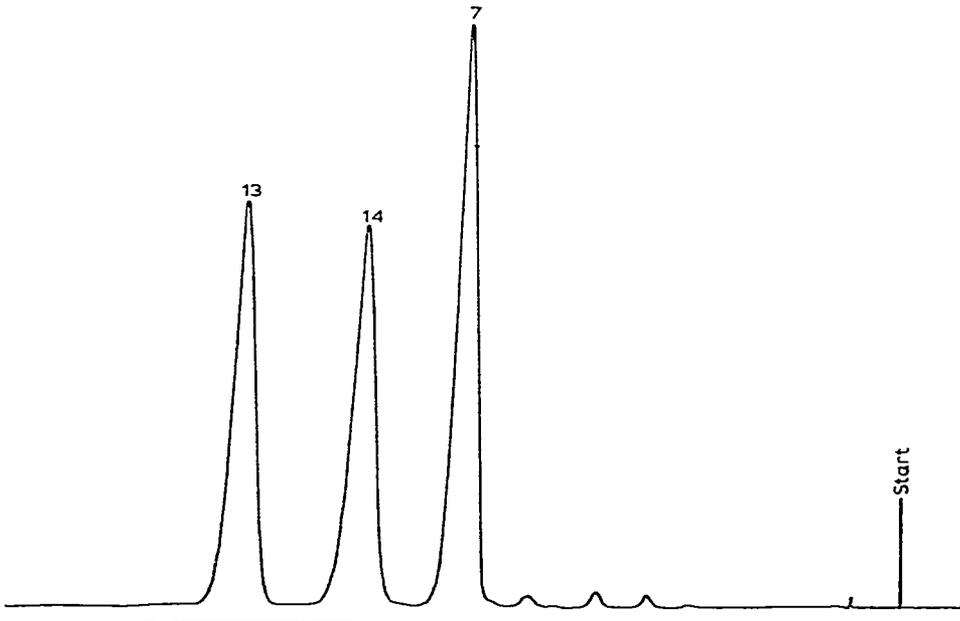


Fig. 3. Chromatogramm verschiedener *all-trans*-Ester von Vitamin A. Bedingungen wie Fig. 1. 7 = Palmitat; 14 = Oleat; 13 = Acetat.

mensetzung parallel mit dem hier beschriebenen und mit dem Vecchi-System¹⁴ chromatographiert. Andererseits wurden die Ergebnisse mit denen der Protonen-Kernresonanzspektroskopie (NMR) verglichen, einer Methode, nach der eine absolute Zuordnung ohne Vergleichssubstanzen möglich ist^{18,19,3}. Für den noch übrigen sechsten Peak, der immer nur in untergeordnetem Masse beobachtet wird, kam praktisch nur noch das 9,13-di-*cis* in Frage. Diese Konstitution wurde folgendermassen wahrscheinlich gemacht: Die zu diesem Peak gehörende Eluatfraktion wurde in einer Quarzküvette bei Raumtemperatur 4 h im Spektralphotometer PMQII (Zeiss) mit Licht der Wellenlänge 325 nm bestrahlt. Dann wurde sofort rechromatographiert. Dabei wurden in der Lösung neben restlichem Ausgangsmaterial die zu erwartenden Isomerisierungsprodukte 9-*cis*, 13-*cis* und all-*trans* nachgewiesen.

DURCHFÜHRUNG

Etwa 50 mg Vitamin-A-Acetat oder -Propionat bzw. etwa 100 mg -Palmitat (auf 0.01 mg genau abgewogen) werden in einem 100-ml-Messkolben in Isooctan gelöst. Nach Auffüllen bis zur Marke werden 5 μ l dieser Lösung in den Chromatographen eingeschleust. Die Dauer der Analyse beträgt 40–45 Min. Für alle Vitamin-A-Lösungen müssen unbedingt braun eingefärbte Glasgefässe verwendet werden.

EICHUNG

Zur Eichung verwenden wir die Methode des äusseren Standards. Da die *cis*-Isomeren nicht in genügender Menge und Reinheit zur Verfügung stehen, verwenden wir für die Eichung ausschliesslich all-*trans*-Vitamin-A-Acetat, das durch Umkristallisieren gereinigt wurde. Die Eichlösung wird täglich frisch durch Lösen von 30–40 mg Acetat in Elutionsmittel und Auffüllen auf 100 ml hergestellt und im Dunkeln aufbewahrt.

Wenn nicht ständig reines kristallines Vitamin-A-Acetat zur Verfügung steht, kann man für die äussere Eichung auf einen Sekundärstandard ausweichen. Als solcher hat sich 1-Nitronaphthalin (F.p. = 56.2–57.0°C) bewährt, das ein ähnliches Absorptionsmaximum besitzt wie Vitamin-A-Acetat und im verwendeten HPLC-System zwischen Anhydrovitamin A und 11,13-di-*cis* zu liegen käme. Der $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ -Wert ist kleiner als der von Vitamin-A-Acetat:

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ Vitamin-A-Acetat in Elutionsmittel: 1494

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 1-Nitronaphthalin in Elutionsmittel: 245.4

Daraus ergibt sich im Prinzip der notwendige Umrechnungsfaktor $N = 1494/254.4 = 6.09$. Dieser Faktor sollte jedoch für jeden Detektor gesondert aus den Peakflächen ermittelt werden, weil hierbei die spektrale Bandenbreite, der Streulichtanteil und die Geometrie der Küvette eine Rolle spielen können. Das geschieht dadurch, dass man genau abgewogene Mengen Eichsubstanz Vitamin-A-Acetat und Eichsubstanz 1-Nitronaphthalin zusammen in Elutionsmittel löst und diese Lösung chromatographiert. Aus Peakflächen und Einwaagen wird der Faktor N wie folgt berechnet: $N = F_{AA}E_{NN}/E_{AA}F_{NN}$. Bei dem von uns verwendeten Detektor ergab sich $N = 5.16$.

Für den mit Vitamin-A-Acetat zu bestimmenden Eichfaktor KF gilt: $KF = F_E/E_E$. Für den mit 1-Nitronaphthalin zu bestimmenden Eichfaktor KF gilt: $KF = KF_N N = F_N \cdot N/E_N$. Bei allen Proben, bei denen das Gebiet der Retentionszeit von 1-Nitronaphthalin freiliegt, kann diese Substanz auch als innerer Standard verwendet werden.

BERECHNUNG

Zur Auswertung der *cis*-Isomeren, die bei $\lambda = 325$ nm alle kleinere Extinktionskoeffizienten haben als *all-trans*, verwenden wir Faktoren, die wir der Literatur entnommen haben²⁰:

	f_i
9- <i>cis</i> -Vitamin-A-Acetat	1.299
11- <i>cis</i> -Vitamin-A-Acetat	1.601
13- <i>cis</i> -Vitamin-A-Acetat	1.089
9,13-di- <i>cis</i> -Vitamin-A-Acetat	1.402
11,13-di- <i>cis</i> -Vitamin-A-Acetat	1.814

Zur Auswertung anderer Ester als Acetat muss noch mit einem Faktor f_{Ester} multipliziert werden, der sich aus dem Verhältnis der Molekulargewichte ergibt, z.B. $f_{\text{Palmitat}} = \text{mol.wt. Palmitat/mol.wt. Acetat} = 524.8/328.5 = 1.598$. Hierbei ist vorausgesetzt, dass nur der Retinolrest für die Absorption bei 325 nm verantwortlich ist.

Die Berechnung für ein Isomeres i erfolgt nach der Gleichung:

$$\text{Isomeres } i (\%) = \frac{F_i \cdot f_i \cdot R_E \cdot 100 \cdot f_{\text{Ester}}}{KF \cdot E_P \cdot R_P}$$

ZUSAMMENFASSUNG

Die sechs bekannten *cis-trans*-Isomeren der Vitamin-A-Ester lassen sich durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an Aluminiumoxid mit Isooctan-Diisopropylether vollständig trennen, wenn man den Wassergehalt des Elutionsmittels in ppm-Bereich sorgfältig optimiert. Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Isomeren wird vorgestellt.

DANK

Die Optimierung der HPLC-Systeme wurde von Herrn Siegfried Hauer durchgeführt.

SYMBOLERKLÄRUNG

$KF = F_E/E_E =$ Eichfaktor

$F_E =$ Fläche des Vitamin-A-Acetat-Peaks bei der Eichung (mV sec)

$E_E =$ Einwage an Vitamin-A-Acetat in 100 ml Eichlösung (mg)

$KF_N = F_N/E_N$

- F_N = Fläche des 1-Nitronaphthalin-Peaks bei der Eichung (mV sec)
 E_N = Einwaage 1-Nitronaphthalin in 100 ml Eichlösung (mg)
 N = $F_{AA}E_{NN}/E_{AA}F_{NN}$
 F_{AA} = Fläche des Vitamin-A-Acetat-Peaks bei der Ermittlung des Faktors N
 E_{AA} = Einwaage Vitamin-A-Acetat bei der Ermittlung des Faktors N
 F_{NN} = Fläche des 1-Nitronaphthalin-Peaks bei der Ermittlung des Faktors N
 E_{NN} = Einwaage 1-Nitronaphthalin bei der Ermittlung des Faktors N
 F_i = Peakfläche des Isomeren i im Chromatogramm der Probe (mV sec)
 f_i = Korrekturfaktor des Isomeren i
 E_P = Einwaage der Probe, gelöst in 100 ml Elutionsmittel (mg)
 R_P = Retentionszeit von all-*trans* beim Chromatogramm der Probe
 R_E = Retentionszeit von all-*trans* beim Eichchromatogramm

LITERATUR

- 1 L. Pauling, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 3 (1939) 203.
- 2 R. M. McKenzie, D. M. Hellwege, M. L. McGregor, N. L. Rockley, P. J. Riquetti und E. C. Nelson, *J. Chromatogr.*, 155 (1978) 379–387.
- 3 B. A. Halley und E. C. Nelson, *J. Chromatogr.*, 175 (1979) 113–123.
- 4 W. Reif und H. Grassner, *Chem.-Ing.-Tech.*, 45 (1973) 646–652.
- 5 P. Karrer, R. Morf und K. Schöpp, *Helv. Chim. Acta*, 14 (1931) 1036.
- 6 O. Isler, W. Huber, A. Ronco und M. Kofler, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 1911 und 1924–1926.
- 7 *Medizin und Chemie*, Abhandlungen aus den medizinisch-chemischen Forschungsstätten der IG Farbenindustrie Eiter, Truscheid, *Med. Ch. I.G.*, 7 (1963) 719 und 733.
- 8 S. Ball, T. W. Goodwin und R. A. Morton, *Biochem. J.*, 42 (1948) 516.
- 9 P. D. Dalvi und R. A. Morton, *Biochem. J.*, 50 (1951) 43.
- 10 R. Hubbard und G. Wald, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1952) 269.
- 11 W. Oroshnik und A. D. Mebane, *J. Amer. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5719.
- 12 B. Barnholdt, *Nature (London)*, 178 (1956) 1401.
- 13 A. Härtel, *Z. Anal. Chem.*, 206 (1964) 188.
- 14 M. Vecchi, J. Vesely und G. Oesterhelt, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 447–453.
- 15 K. Tsukida, A. Kodama, M. Ito, M. Kawamoto und K. Takahashi, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 23 (1977) 263.
- 16 J. E. Paanakker und G. W. T. Groenendijk, *J. Chromatogr.*, 168 (1979) 125–132.
- 17 J. E. Paanakker, J. C. Kraak und H. Poppe, *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 111–126.
- 18 M. Mousseron-Canet und J. C. Mani, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1966) 3285.
- 19 O. Isler, *Carotenoids*, Birkhäuser, Basel, 1971, p. 213.
- 20 M. Kofler und S. H. Rubin, *Vitam. Horm. (New York)*, 18 (1960) 323.